

BEST AVAILABLE COPY

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—35004

⑩ Int. Cl.³
A 61 K 39/275

識別記号

府内整理番号
7432—4C

⑬ 公開 昭和55年(1980)3月11日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 5 頁)

④ 細胞性免疫賦活剤及びその製法

② 特願 昭53—107008

② 出願 昭53(1978)9月2日

② 発明者 荒川清二

横浜市港北区日吉本町2345

② 発明者 関富雄

東京都大田区南馬込5—7—6

② 発明者 松岡秀一

東京都渋谷区広尾5—19—8

⑦ 発明者 原田初典

東京都杉並区高円寺南5—30—3

⑦ 発明者 二宮道成

広島県高田郡甲田町下小原77

⑦ 出願人 涌永薬品株式会社

大阪市福島区福島3丁目1番39号

⑦ 代理人 弁理士 朝内忠夫 外3名

明細書

1. 発明の名称 細胞性免疫賦活剤及びその製法

2. 特許請求の範囲

1. 雌卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で継代培養されるか、又はマウス腎臓細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で継代培養された後に雌卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層に移植、継代培養されることによつて家兔に対して殆んど又は全く発痘力を示さない程度に弱毒化され且つ体液性免疫性を実質的に失つたが細胞性免疫活性を強化されたワクチン・ウイルス弱毒株を有効成分として含有することを特徴とする細胞性免疫賦活剤。

2. ワクチン・ウイルスを、雌卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で、家兔に対して殆んど又は全く発痘力を示さない程度に弱毒化され且つ体液性免疫性を実質的に失うまで継代培養するか、又はマウス腎臓細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で継代培養し次いで、雌卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層に移植し、

家兔に対して殆んど又は全く発痘力を示さない程度に弱毒化され且つ体液性免疫性を実質的に失うまで継代培養し、こうして得られたワクチン・ウイルス弱毒株を常法で採取、精製することを特徴とする、細胞免疫賦活剤の製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はワクチン・ウイルス弱毒株を有効成分とする細胞免疫賦活剤に關し、またその製法に関する。

從来、微生物領域において、著しい細胞免疫反応を起すものとしては、細菌領域における結核菌と、ウイルス領域におけるワクチン・ウイルスとがあげられる。前者は最近BCG、あるいは結核菌壁物質による免疫学的制ガン作用の確認によつて著しい注目を浴びているが、副作用につきまとわれて必ずしも臨床的応用はひろく行われるまでに至っていない。他方ワクチン・ウイルスの制ガン作用については一時注目されたが、体液性免疫成立のため、この免疫が成立すると制ガン効果が上らず現在全く注目されていない。

BEST AVAILABLE COPY

本発明者らは、ワクチンア・ウイルスの体液性免疫力を抑制して細胞性免疫性を強化されたワクチニア・ウイルス弱毒株を得る目的で種々研究をした。その結果、ワクチニア・ウイルスをマウス腎臓細胞の組織培養で得た単層細胞層中で継代培養した後に、若しくは直ちに、鶏卵胎児細胞の組織培養で得た単層細胞層中で、ワクチニア・ウイルスを継代培養すると、このウイルスは弱毒化して家兎に対して殆んど又は全く発痘力を示さなくなり、しかも体液性免疫力が実質的に消失して且つ細胞性免疫力が強化されるようになり、こうして得られたワクチニア・ウイルス弱毒株が細胞性免疫賦活剤として利用できることを知見した。

それ故、第一の本発明の要旨とするところは、鶏卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で継代培養されるか、又はマウス腎臓細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で継代培養された後に鶏卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層に移植、継代培養されることによつて家兎に対して殆んど又は全く発痘力を示さない程度に弱毒化

3

ワクチニア・ウイルス伝研ノ号株、ワクチニア・ウイルス・リスター株及び池田株、等がある。このワクチニア・ウイルス株を継代培養するのに培地として用いられるマウス腎臓細胞の単層細胞層、並びに鶏卵胎児細胞の単層細胞層の調製は夫々の細胞の組織培養技術上公知の手法で行われ、またこれら単層細胞層中のワクチニア・ウイルスの継代培養も無菌条件下で公知の手法で行い得る。ウイルスの継代培養に用いる温度は33~37°Cの範囲であるのが好ましい。継代培養の継代回数は、培養されたウイルス株が家兎に対して殆んど又は全く発痘力を示さなくなるまで反復され、その発痘力の有無の検定は種痘ワクチン調製上公知の手法で行われる。マウス腎臓細胞の単層細胞層中の継代培養の回数は培養条件によつて左右されるけれども100回以上であるのが好ましく、また鶏卵胎児細胞の単層細胞層中の継代培養の回数は培養条件によつて左右されるけれども3回以上であるのが好ましい。

このように継代培養されて体液性免疫力を実質

特開 昭55-35004(2)

され且つ体液性免疫性を実質的に失つたが細胞性免疫活性を強化されたワクチニア・ウイルス弱毒株を有効成分として含有することを特徴とする細胞性免疫賦活剤にある。

さらに第2の本発明の要旨とするところは、ワクチニア・ウイルスを、鶏卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で、家兎に対して殆んど又は全く発痘力を示さない程度に弱毒化され且つ体液性免疫性を実質的に失^{まで}し^て継代培養するか、又はマウス腎臓細胞の組織培養で得られた単層細胞層中で継代培養し次いで、鶏卵胎児細胞の組織培養で得られた単層細胞層に移植し、家兎に対して殆んど又は全く発痘力を示さない程度に弱毒化され且つ体液性免疫性を実質的に失^{うまで}し^て継代培養し、こうして得られたワクチニア・ウイルス弱毒株を常法で採取、精製することを特徴とする、細胞免疫賦活剤の製法にある。

本発明でワクチニア・ウイルス弱毒株を得るために継代培養されるワクチニア・ウイルス株の例としては、国立予防衛生研究所に保管されてある

4

的に消失し且つ細胞性免疫力を強化されたワクチニア・ウイルス弱毒株は、一般のウイルスワクチン調製上公知の手法と同じ方法で採取、精製されてワクチン製剤と同じ形態で得られる。このウイルス弱毒株ワクチンは加熱により不活化してもよい。

本発明の免疫賦活剤で有効成分として用いられる上記のワクチニア・ウイルス弱毒株は、人体、家兎に対して発痘力がないが、細胞性免疫賦与力が従来公知のワクチニア・ウイルス弱毒株より遙かに強力であり、神經親和性がなく、これを用いると、生のワクチニア・ウイルスのみならず、不活化ウイルスも、また悪性腫瘍の発育をも抑制することができる。

本発明の免疫賦活剤は適切な投与方法で使用され、注射剤を調製する場合は、上記主薬にpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、賦形剤などを添加してもよく、さらに常法により凍結乾燥を行い、凍結乾燥注射剤を作ることができ、また主薬にpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、等強剤、局麻剤等を添加し、

5

-30-

6

BEST AVAILABLE COPY

常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤を作ることもできる。凍結乾燥することもできる。

固型製剤を調製する場合は、主薬に通常の賦形剤、安定化剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、味増剤、防腐剤などを加えたのち常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を作ることができる。

本発明の免疫賦活剤の有効成分投与量は、症状により異なるが、マウスの細胞性免疫力を向上させるためには、力価 2×10^8 PFU/ml のもので $0.1 \text{ ml} \sim 0.001 \text{ ml}$ であり、1日1回又は2日あるいは3日に1回投与するのがよい。

次に本発明を実施例及び試験例について説明する。

実施例1

(1) D D N マウスの腎臓細胞を無菌的にとり出し、ペニシリン、ストレプトマイシン添加 BSS [ペニシリン 100 単位、ストレプトマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた緩衝塩類溶液 (BSS)] で洗浄後、腎皮質部を一辺約 3 mm の立方形に切り、

7

20% よりなる混合物にペニシリン、ストレプトマイシンを上記の量加えたものである。

細胞数を測定し、新に培養液を追加して $1 \sim 3 \times 10^5$ 細胞/ml に希釈した。試験管に 2 ml ずつ分注し密栓し、 37°C で培養し、単層細胞シートをつくらせる。単層細胞シートが出来たら培養液を代えた。

(2) 上記の単層細胞シートに精製無菌ワクチン・ウイルス伝研 1 号株を 0.1 ml (M.o.i.) 接種し、約 37°C で 4 日間培養し細胞変性 (CP) の発現を指標として培養を停止し、培養液の $1/10$ 量を以て 2 代に植えつぐ。かくすこと継代培養が 1/15 代に及んだ後、孵化 9 日鶏卵胎児の皮膚 - 筋肉部を上記マウス腎臓細胞と同様に処理して単細胞浮遊液として組織培養し、これによつて単細胞シートを試験管ガラス上につくらせて、これにウイルスを移植する。マウス腎細胞の場合と同様に約 37°C で継代培養して 5 代に及んだ培養ウイルス液を、孵化 12 日の鶏卵胎児膜 5 個に 0.1 ml ずつ接種する。この孵化鶏卵を 37°C でさら KC 48

特開 昭55-35004(3)

一匹分の腎組織を B S S で数回洗つて血液ができるだけ除去し、300 ml 入りの消化コルベンに移し、100 ml の液を加えてよくゆり動かしてから液をアスピレーターにつけた滅菌ビペットで吸引して捨て、さらにあらかじめ 37°C に加温しておいた 0.25% トリプシン添加 B S S を加え室温でマグネチック・スターラーでなるべくゆるやかを回転で 30 分間搅拌する。その後、スターラーから離し、組織が沈下したところで細胞液をくみ出し、 4°C の氷水中に置いた瓶にとる。消化コルベンにあらかじめ 37°C に暖めておいた新しいトリプシン液を 100 ml 加え、スターラーに 30 分かかる。以後同様の操作を数回くり返し、最後に全部の細胞を滅菌ステンレス金網 (最初 80 メッシュ、後 20 メッシュ) で済過し、大きなかたまりを除き、遠心管にとり遠心管容量の約半量を入れる。ハンクス (Hanks) 液半量を加えて 1000 r.p.m. で 3 分遠心し、沈渣を少量の培養液に再浮遊してペールする。

この培養液の組成は Y L E 80% 及びウシ血清

8

時間培養すると、微小な痘瘻を膀胱膜上にみとめ、孵化 12 日鶏卵胎児膜に接種培養法によつて力価をみると 2.3×10^8 PFU/ml であつた。このように得たワクチン・ウイルス弱毒株を A S 株と称することにした。

(3) 上記の培養ウイルス液をジクロロジフロロエタンを用いて Epstein 法 (Epstein, M. A. 「Brit. J. Exp. Path.」 39, 436, 1958), ついで麻糖密度勾配遠心法 (Planterose, D. N., Nishimura, C., Salzman, N. P., 「Virology」 18, 204, 1962) で精製して力価 2×10^8 PFU/ml のウイルス液 (以下、A S 株原液といふ) を得る。

従来公知の株であるワクチン・ウイルス M/15 株、M V A 株についても、同様に孵化 12 日鶏卵胎児膜に接種し、M/15 株は 37°C , 4 日間、M V A 株は 2 日間放置して膀胱膜上に痘瘻が密発、生存しているものの膀胱膜をとり、乳剤とし、上記 Epstein 法及び麻糖密度勾配法にて精製し、力価測定を行い、何れも 2×10^8 / ml の力価に調整した比較ウイルス株原液を得た。

9

-31-

10

BEST AVAILABLE COPY

以下に、A S 株の免疫応答について下記の試験例で調べた。

1) A S 株原液、これを希釈した 10^{-1} 液乃至 10^{-7} 液をそれぞれ 0.2 ml ずつ体重約 2 kg のワクチニア・ウイルスに対する中和抗体のない家兎 2 匹の剃毛した皮膚内に注射して観察した。原液をのぞき発赤をみたものがなく、ワクチニア・ウイルス特有の硬結、腫脹は全くみとめられなかつた。

2) Cunningham 法による IgM 抗体産生力の検出。S P F の D D N マウス 5 匹ずつに 10^6 羊血球 P B S 液 0.2 ml を尾静脈に注射し、同時に上記 A S 株、M 15 株の 10^{-1} 液、対照群には P B S 液（ウイルス含有せず）を 0.1 ml 腹部に注射後 4 日目に殺し、P F C を検討した（Cunningham A. J., Smith, J. B. & Mercer, E. H., 「J. exp. med.」 124, 701, 1966）。溶血斑数の平均は A S 株接種群、M 15 株接種群、対照群それぞれ 87.4 ± 65.5 ; 140.8 ± 33.1 , 85.0 ± 30.1 であり、M 15 株接種群と対照群との間には有意 ($P < 0.05$) の上昇がみられたが A S 株接種群

接種ワイルズ	11					
	不活 A S	10^{-1} A S	10^{-2} A S	10^0 M 15	10^{-1} M 15	10^{-2} M 15
対照	1.48 ± 0.23	1.52 ± 0.28	1.40 ± 0.30	0.8 ± 0.41	1.15 ± 0.29	0.9 ± 0.32
第 1 回羊血球 注射時ワイルズ接種群	0.89 ± 0.37			0.95 ± 0.25	0.84 ± 0.35	0.62 ± 0.33
足腫脹の平均増加 (mm)					1.06 ± 0.33	1.04 ± 0.33

接種ワイルズ	12					
	第 1 回羊血球 注射時ワイルズ接種群	第 2 回羊血球 注射時ワイルズ接種群	不活 A S	10^{-1} A S	10^{-2} A S	10^0 M 15
			1.48 ± 0.23	1.52 ± 0.28	1.40 ± 0.30	0.8 ± 0.41

特開 昭55-35004(4)
との間には有意の差がみとめられなかつた。これによつて体液性免疫力少くとも I G M 抗体産生がないことが認められた。

3) 遅延型過敏症反応 (Delayed-type Hypersensitivity) の増強力

羊血球 $10^8 / 0.05$ ml 個を I C R 系の S P F マウスに 10 匹宛 0.05 ml 左後肢足趾に $1/5$ 針にて注射して感作する。これと同時に、又はこれより一週間後に第 2 回羊血球注射時に、A S 株及び M 15 株の夫々の原液 (10^0 A S), それを希釈した 10^{-1} 液及び 10^{-2} 液、並びに A S 株原液を 60°C , 30 分間加熱することにより不活化した液（不活 10^0 A S）を 0.1 ml づつマウス皮下に注射して接種する。対照マウスには、P B S 液を同様に注射した。第一回羊血球注射時一週間後に、右後肢足趾の厚みをノキスで測り、その後に羊血球 $10^8 / 0.05$ ml を該足趾に注射して 24 時間後に再び足趾の厚みを測り、その腫脹度を遅延型過敏症反応 (D T H 反応) の目安として検べた。その結果を次表に示す。

12

ウイルスを第 2 回羊血球注射の 1 週前すなわち第 1 回羊血球注射時に注射した分のみ有意に強い腫脹をみた。すなわち A S 株は細胞免疫性が従来のウイルス株に比べ著しく強いことが認められた。

4) S P F の I C R マウス (5 週令) に肉腫 180 の細胞数 $10^7 / \text{ml}$ を 60°C , 30 分加温したもの腹腔に 0.1 ml ずつ注射し、1 週後生細胞 $10^6 / 0.1$ ml を右肢皮下に接種した。A S 株 10^{-1} 液又は 60°C , 30 分間加熱で不活化した A S 株 10^{-1} 液を 3 日目毎 IC 注射して 20 日後に殺し腫瘍の重さを対照と比較したところ、対照群は 5.47 ± 1.89 g に対し処理群は生ウイルスの場合 2.65 ± 1.26 g 及び不活化ウイルスの場合 2.57 ± 1.38 g 有意に腫瘍細胞の発育を抑えることがわかつた。

5) A S 株原液又は伝研 1 株 (力価 $10^{-8} / \text{ml}$) を 10 匹ずつ D D N マウスに注射して経日的に殺して、脳標本を Coons の方法でつくり (Coons, A. H. et al 「J. Exp. Med.」 93, 173, 1961)、蛍光抗体間接法にてフルロレスチンイリチアネー

BEST AVAILABLE COPY

特開 昭55-35004(5)

トによる抗血清ラベル法で検討したところ、伝研
ノ株は72時間以後常にウイルスを検出することが出来たが、AS株には接種8日まで検して全く
検出することが出来なかつた。これによつてAS
株は神経親和性がないことが認められた。

代理人 朝 内 忠 夫
同 八 木 田 茂
同 浜 野 孝 雄
同 森 田 哲 二